

# Biomedical Engineering

---

**3D@UniPV**

Virtual Modeling and Additive Manufacturing for Advanced Materials

## Stampa 3D di un bioreattore per modello in vitro di midollo osseo

Candidato: Marta Gaviraghi

Relatore: Michele Conti

Correlatore: Stefania Marconi

Anno accademico: 2014/2015

---

Università degli Studi di Pavia - Structural Mechanics Department

# Come si formano le piastrine?

## ➤ Da emocitoblasti a piastrine

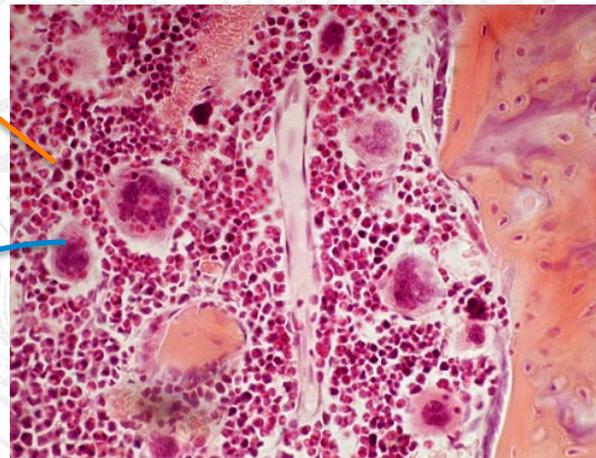
EMATOPOIESI



- Il processo di ematopoiesi avviene nel **midollo osseo**

EMOCITOBLASTI

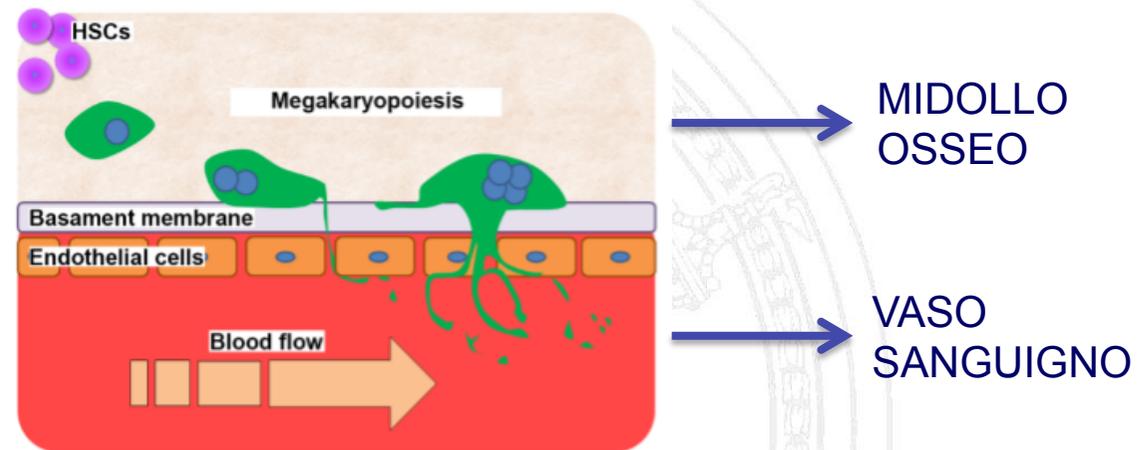
MEGACARIOCITA



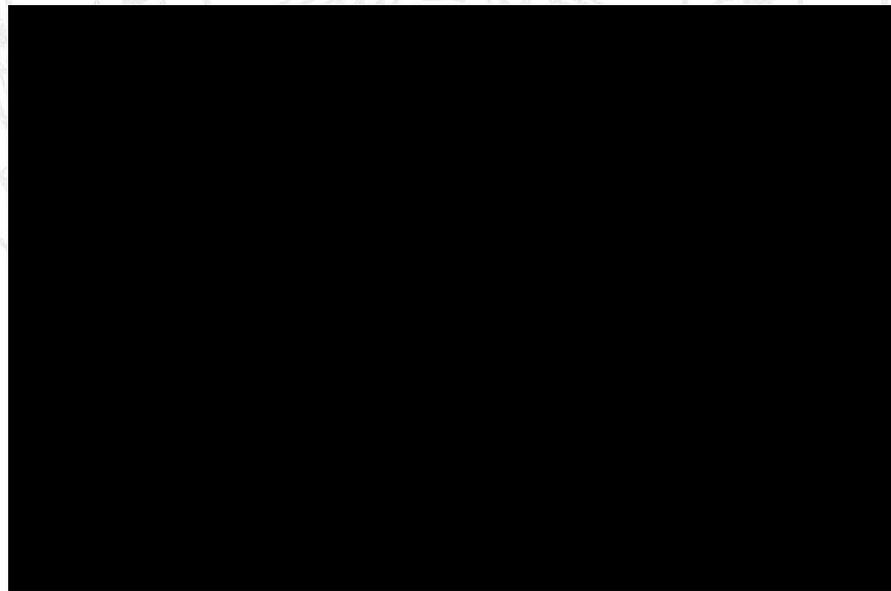
- Subisce anche l'influenza di **organi lontani** tramite le citochine e ormoni come ad esempio trombopoietina (TPO)

## Da megacariocita a piastrine

- Megacariocita si estende e si ramifica
  - Ramificazioni chiamate: PROPIASTRINE



- Megacariocita che rilascia piastrine



# Sistemi alternativi di produzione delle piastrine

---

## Motivi:

### ➤ Scarsità di cure cliniche per malattie che colpiscono le piastrine

- Limitata conoscenza dei meccanismi che avvengono nel midollo osseo

### ➤ Trasfusioni di piastrine

- Terapia di supporto durante la chemioterapia/radioterapia
- 4 milioni di piastrine trasfuse all'anno nel mondo
- Negli Stati Uniti la domanda di piastrine supera l'offerta di 533K unità piastriniche
- Restano 5 giorni prima di essere contaminate battericamente
- A livello globale il mercato delle piastrine ha un valore di oltre 12 milioni \$



### ➤ Chirurgia e riparazione dei tessuti

## Sistemi ex vivo per la produzione di piastrine

---

- **Midollo osseo su un chip.** Donald Ingber et al. Harvard Boston. Nature methods 2014.
- **Analisi comparativa di piastrine umane generate ex-vivo e piastrine generate dai megacariociti nei topi.** Mortimer Poncz et al. Philadelphia. Blood 2015.
- **Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds.** Larry C. Lasky et al. Collumbus Ohio. Experimental Hematology 2009.
- **Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes.** Koji Eto et al. Experimental Hematology 2013.
- **Separation of in-vitro-derived megakaryocytes and platelets using spinning-membrane filtration.** Schlinker AC et al Biotechnol Bioeng 2015
- **Platelet bioreactor-on-a-chip.** Thon JN et al. Blood 2014.
- **Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies.** Alessandra Balduini. Tufts Boston and Pavia. Blood 2015.

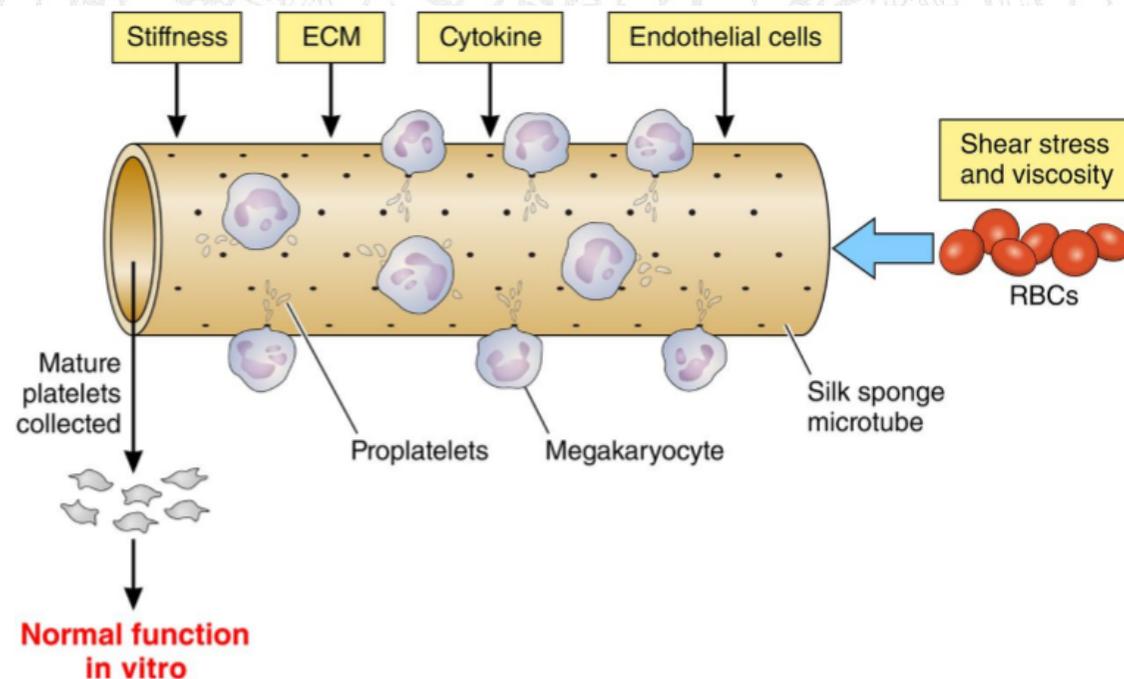
## Nicchia 3D in seta del midollo osseo

### ➤ Modello 3D in seta:

- Riproduce la fisiologia del midollo osseo
- Produzione ex-vivo di piastrine

### ➤ Sistema:

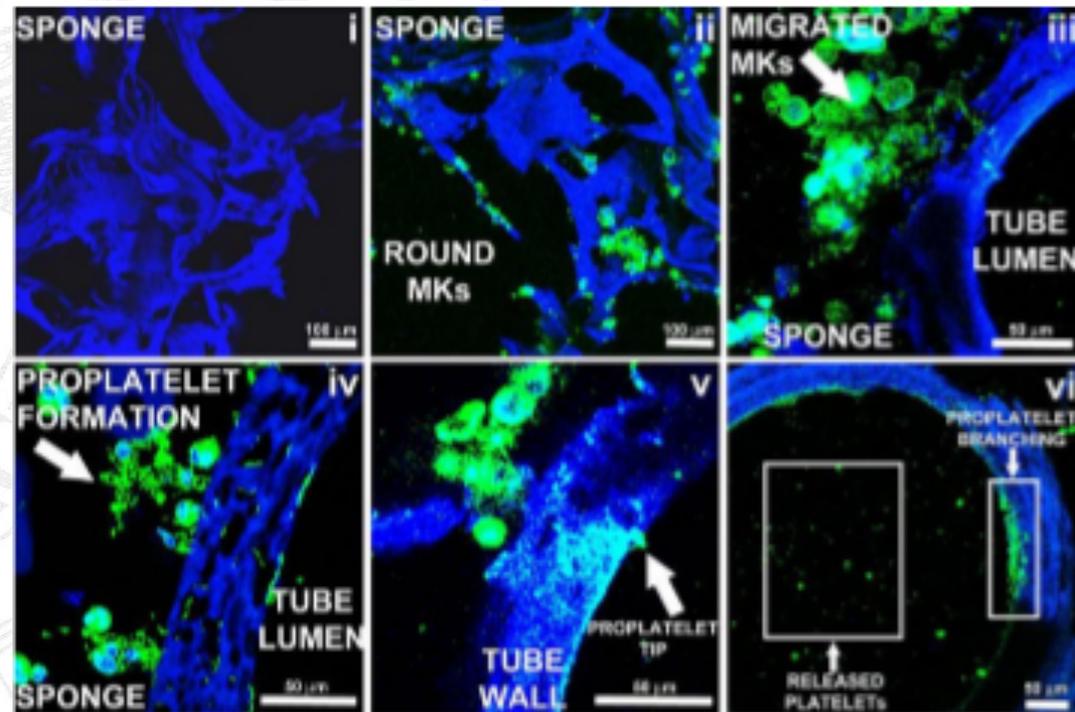
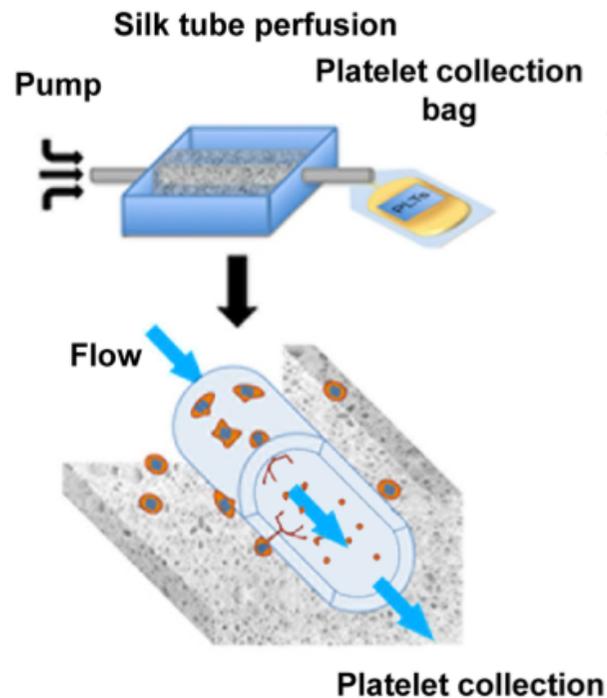
- Microtubo di seta → vascolarizzazione del midollo osseo
- Spugna di seta → architettura spugnosa del midollo osseo



"Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies", Di Buduo et al

## Nicchia 3D in seta del midollo osseo

### ➤ Produzione di piastrine



- Megacariociti coltivati su spugna di seta (ii) migrano dalla spugna di seta alla parete del microtubo (iii) aderiscono alla parete del microtubo e formano le propiastriane (iv).
- Estensione delle propiastriane attraverso la parete del microtubo(v) poi le piastrine vengono rilasciate nel microtubo di seta (vi)

"Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies", Di Buduo et al

# Sistema alternativo al modello nicchia 3D in seta

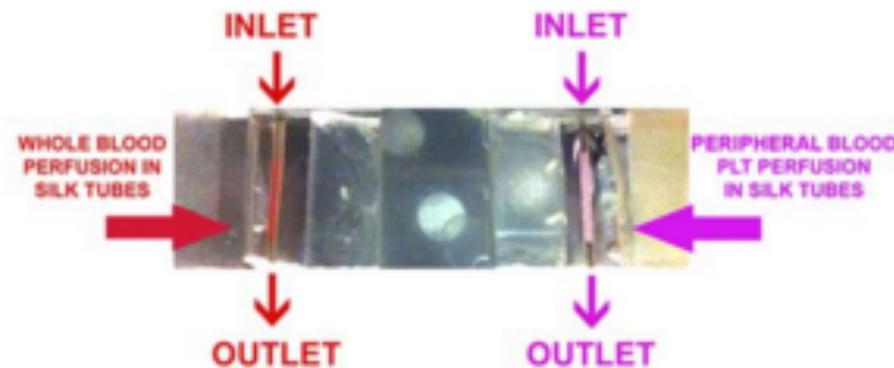
## Nicchia 3D in seta del midollo osseo

### ➤ Vantaggi

- Piastrine prodotte valide per analisi

### ➤ Limiti:

- Numero di piastrine per megacariocita basso
- Sistema artigianale



- Sistema piccolo

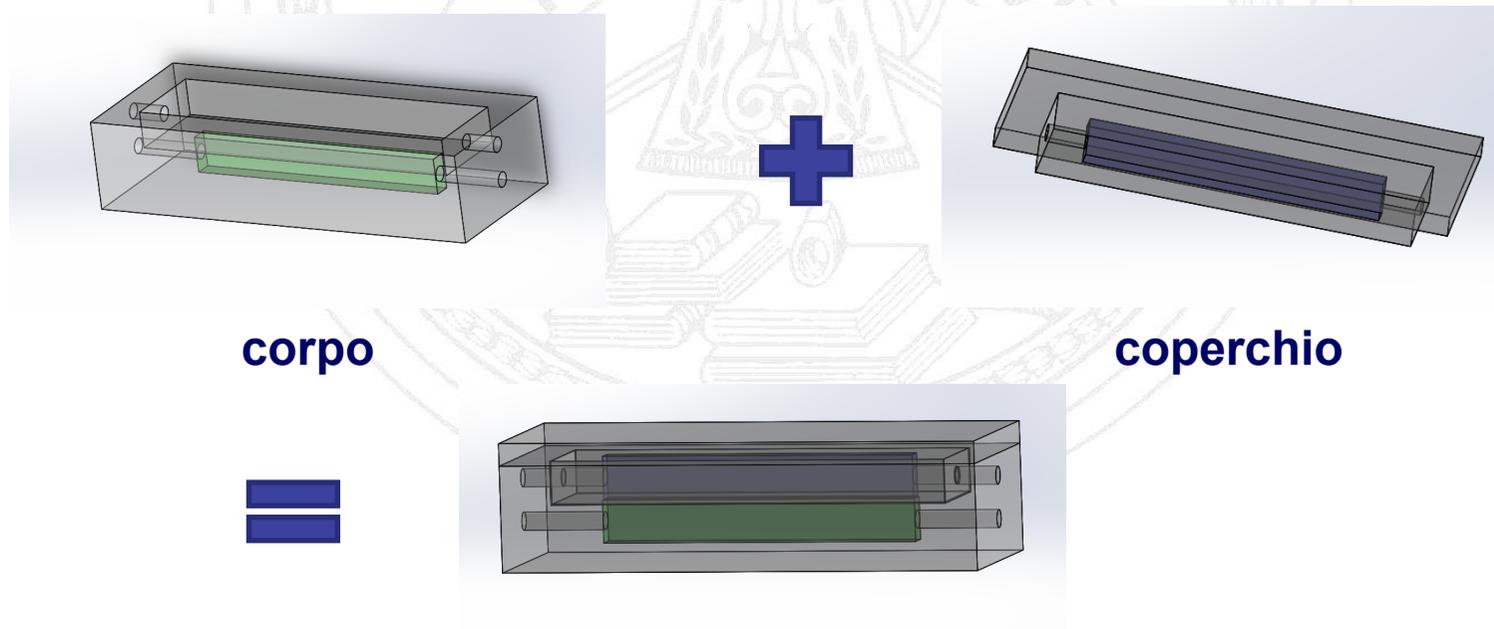
### ➤ Come superare questi limiti?

- Creare un **nuovo sistema** per produrre ex vivo piastrine
- Idea: “*srotolare*” la struttura → non più tubicino avvolto da spugna di seta ma film di seta sopra e sotto spazio per piastrine

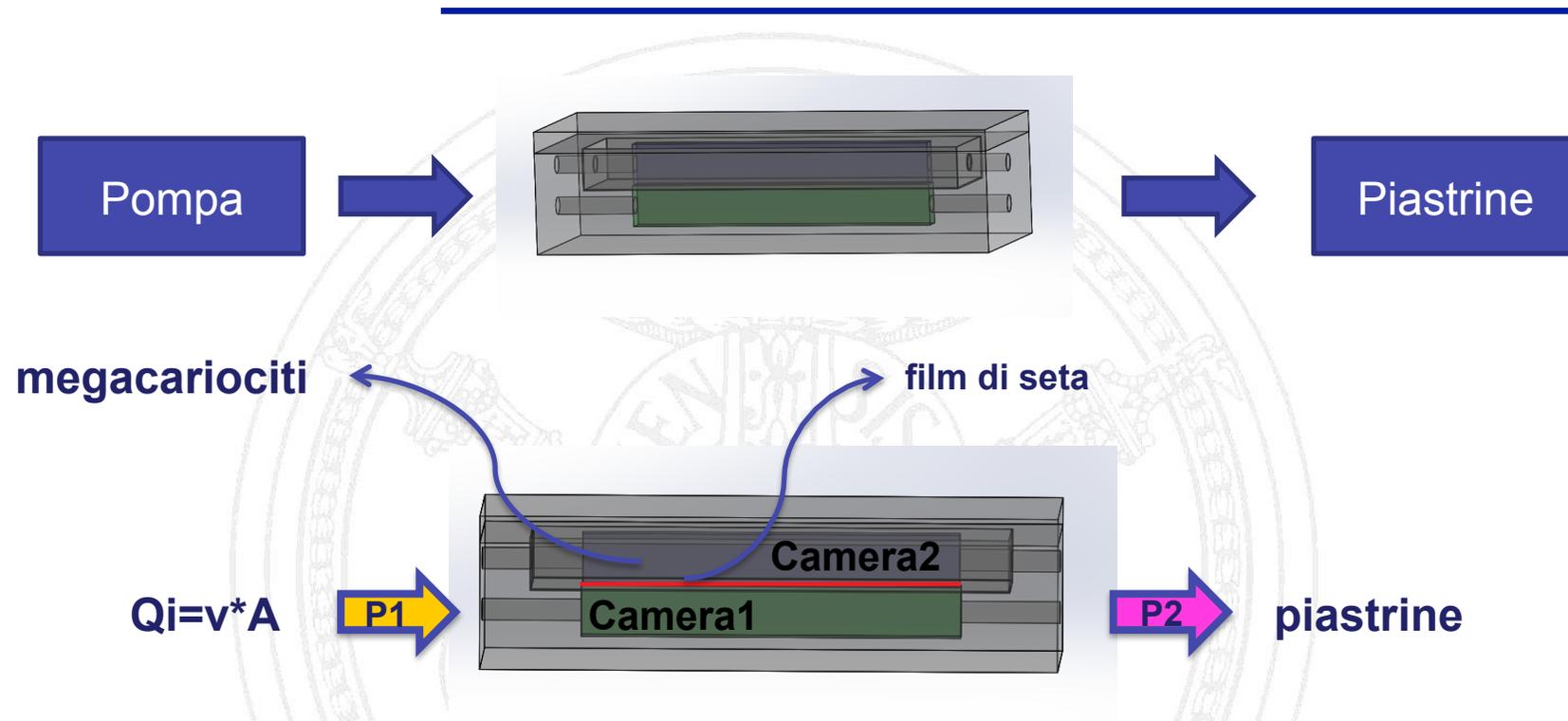
## ➤ Obiettivi:

- Chiarire il complesso fenomeno della formazione di piastirne
- Massimizzare il numero di piastirne prodotte → trasfusioni
- Sistema ripetibile

## ➤ Nuovo sistema



## Nuovo sistema

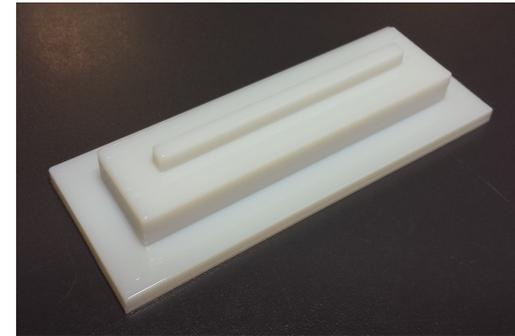
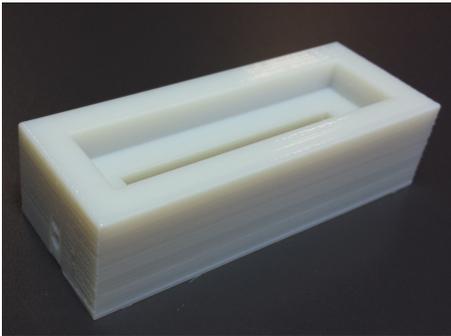


### VARIABILI

GEOMETRICHE	FLUIDODINAMICHE	CELLULARI
Volume camera 1	$DP = P2 - P1$	Densità
Volume camera 2	$P3$	
Superficie di contatto	$v$	

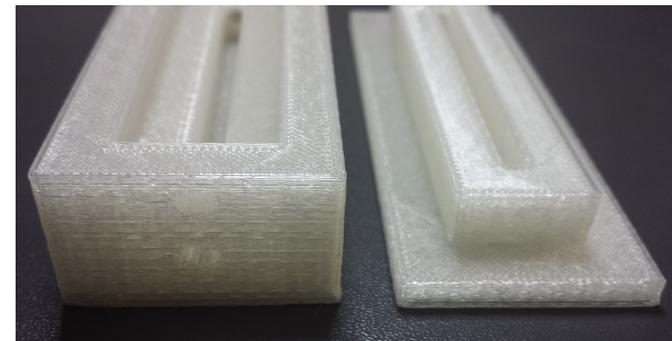
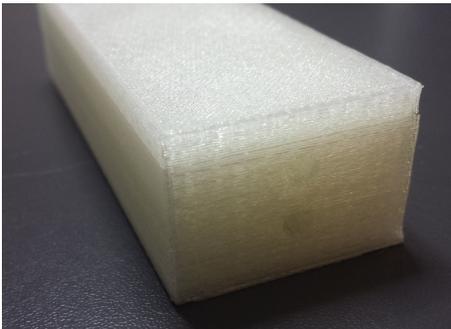
## Come creare il sistema?

- **Stampa 3D:** unico sistema che in poco tempo crea la geometria desiderata.
- Che **materiale** usare?
  - **Resinafotopolimerica** → Tecnologia Polyjet



problema: **cellule morte**

- **PLA** → tecnologia FDM



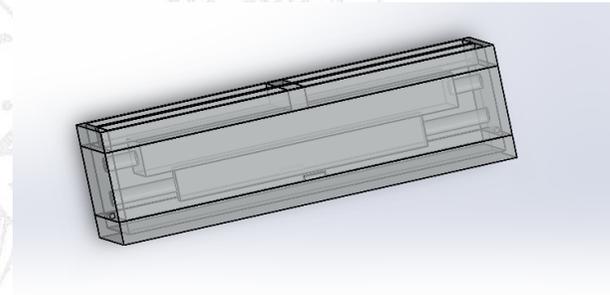
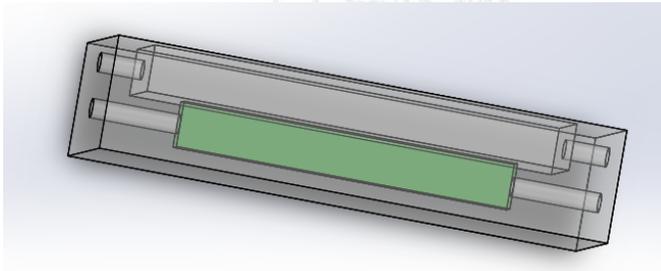
problema: **materiale poroso**

**SOLUZIONE** ?

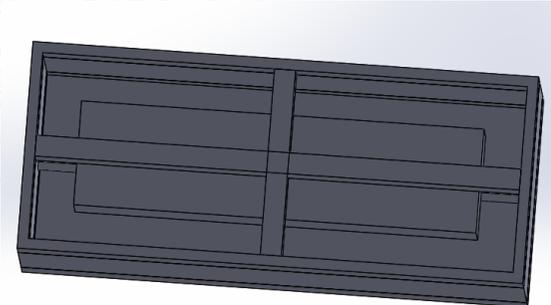
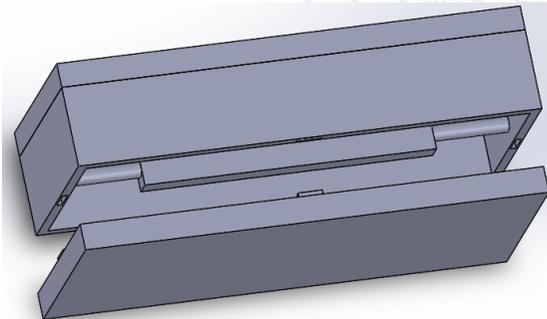
## SOLUZIONE



- Utilizzare un materiale **biocompatibile** e **impermeabile**: PDMS
- Creare un **NEGATIVO** della camera e colare il PDMS

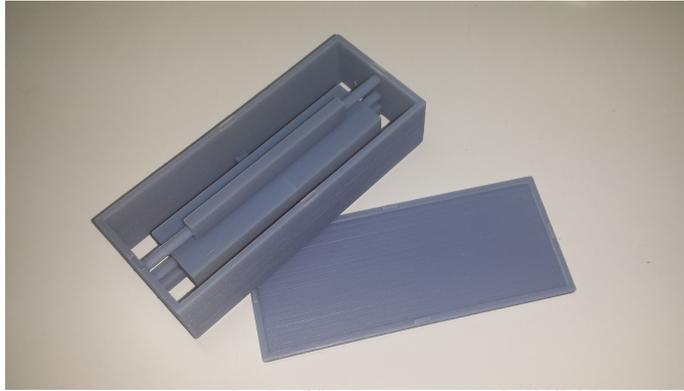


- Progettazione negativo della camera (**Solidwork**)
  - Divisione ogni parte in 2 pezzi per rimuovere il silicone
  - Bracci di supporto per il corpo della camera

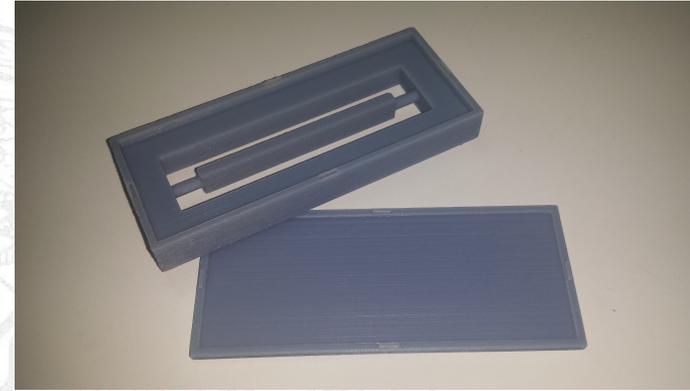


## Da negativo a camera

- Negativo realizzato con stampa 3D



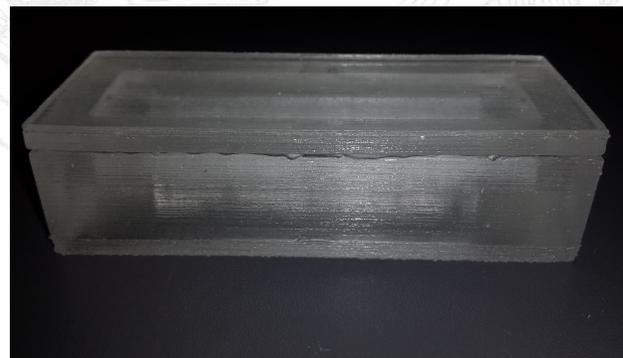
**corpo**



**coperchio**

- Ogni pezzo trattato con distaccante (plastificante spray)
- Assemblaggio dei pezzi con vinavil e riempimento con il silicone
- Camera che fa vuoto per rimozione delle bolle
- Rimozione dello stampo

**RISULTATO**

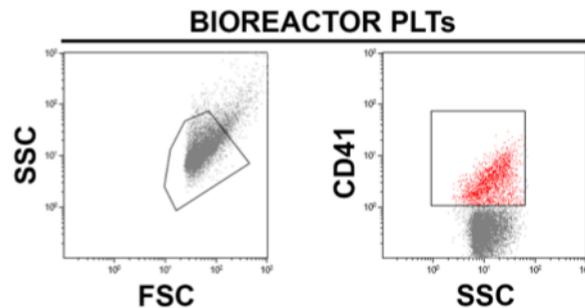
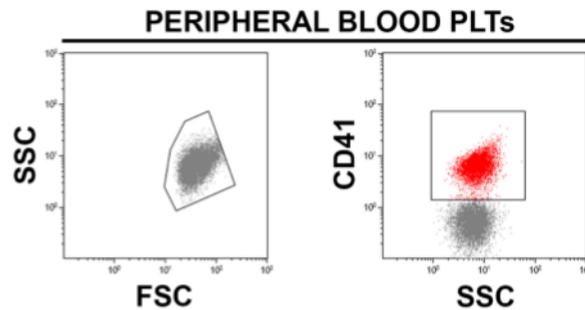


## Validazione della camera

- Test con **spugna di seta**:



- Bontà del sistema: citofluorimetria



### DOT-PLOT

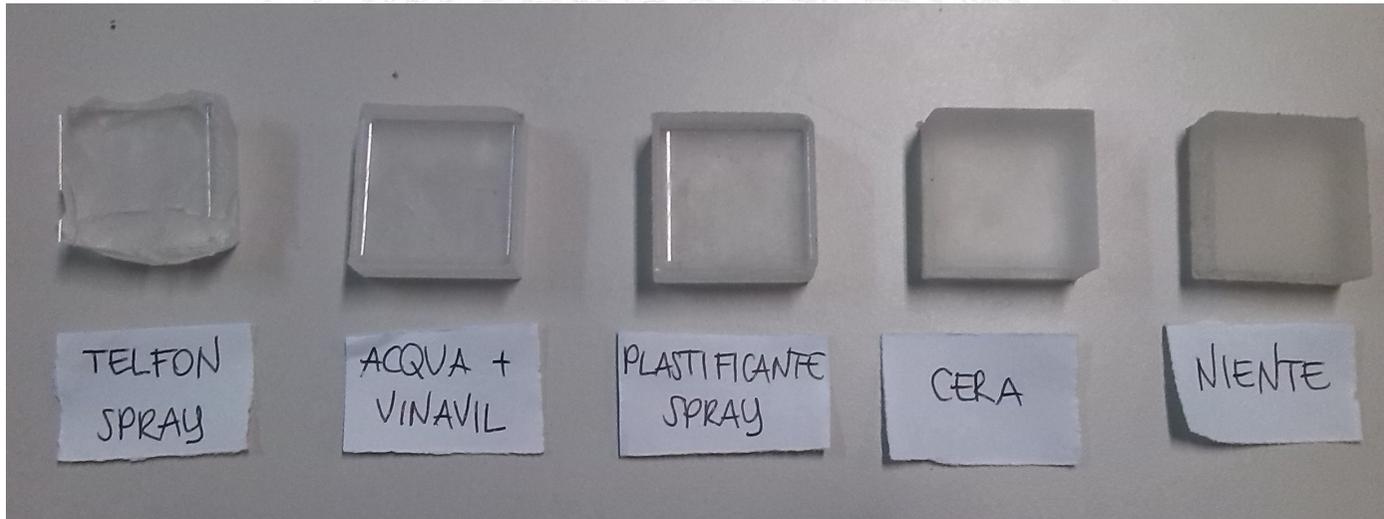
FSC (Foward scatter): dimensione della cellula  
SSC (Side scatter): complessità della cellula

— cellule risultate CD-41 positive quindi effettivamente piastrine

Conclusioni: applicando un flusso lento in ingresso si ottengono pochi megacariociti nel flusso di uscita.

Ma ancora poche piastrine a partire da un megacariocita.

- È possibile utilizzare la stampa in **gesso**?
  - Test: utilizzo 4 diversi distaccanti + 1 controllo



### ■ Risultati:

- Reticolazione del PDMS: non ci sono apparenti differenze tra i vari stampi
  - Adesione del PDMS: acqua+vinavil e telfon spray adesione maggiore
  - Rigidità del PDMS: telfon spray rigidità maggiore
- **Conclusioni:** utilizzare lo stampo in gesso senza NESSUN trattamento

## ➤ **Pro del nuovo modello:**

- Modello scalabile e ripetibile
- Trasparente
- Sistema senza perdite

## ➤ **Limitazioni**

- Test eseguiti solo con spugna di seta e non con film di seta
- Elevato costo del PDMS e difficile reperibilità di esso
- Metodo empirico: no studi parametrici

## ➤ **Sviluppi futuri:**

- Grafici di parametri di input e di design in funzione del numero di piastrine prodotte
- Fare esperimenti con il film di seta

Stampa 3D di un bioreattore per modello in vitro di midollo osseo

---

## **Grazie per l'attenzione**

Un ringraziamento particolare al Dott. Michele Conti,  
alla Dott.ssa Stefania Marconi, alla Prof.ssa  
Alessandra Balduini e al Dott. Christian Di Buduo

## ➤ Tecnologia Polyjet:

- La stampante 3D deposita i fotopolimeri in forma liquida che reticolano tramite la catalizzazione con raggi UV
- Il modello è realizzato strato per strato partendo da una geometria virtuale 3D (modello CAD)



## ■ Tecnologia FDM

- Il filamento termoplastico viene scaldato ed estruso
- La stampante scalda il filamento oltre il suo punto di rammollimento e lo deposita in sottili filamenti lungo il percorso di estrusione
- Le parti vengono costruite strato per strato

